

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 196 07 202 A 1

⑤ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
C 12 Q 1/68  
C 07 H 1/08  
C 07 H 21/00  
G 01 N 1/28  
G 01 N 33/48

⑳ Aktenzeichen: 198 07 202.6  
㉑ Anmeldetag: 28. 2. 98  
㉒ Offenlegungstag: 28. 8. 97

DE 196 07 202 A 1

㉗ Anmelder:

Michel, Uwe, Dr., 37077 Göttingen, DE; Rau,  
Andreas, 37120 Bovenden, DE

㉘ Vertreter:

H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

㉙ Erfinder:

Michel, Uwe, Dr., 37077 Göttingen, DE; Rau,  
Andreas, 37120 Bovenden, DE; Rieckmann, Peter,  
Dr., 97078 Würzburg, DE

㉚ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

US 54 59 253  
US 48 30 989  
EP 03 89 083 A2

BERGER, Shelby L., KIMMEL, Alan R.: Methods in  
Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning  
Techniques, Academic Press, Inc., Orlando, 1987,  
S.215-241;

DAHLBERG, James E., ABELSON, John N.: Methods  
in Enzymology, Vol. 180, RNA Processing, Part A  
General Methods, Academic Press, Inc., San Diego,  
1989, S.24-41;

DAHLBERG, James E., ABELSON, John N.: Methods  
in Enzymology, Vol. 181, RNA Processing, Part B  
Specific Methods, Academic Press, Inc., San Diego,  
1990, S.30-37;

SAITOH, Tohru, et al.: Phase separation in aqueous  
micellar solutions of nonionic surfactants for protein  
separation. In: trends in analytical chemistry, Vol.14,  
No.5, 1995, S.213-217;

KENNEDY, Ford: Faster & Safer Isolation of Genomic  
DNA from Whole Blood & Animal Cell Cultures. In:  
International Biotechnology  
Laboratory, April 1993, S.34;

JAHNS, Axel: Centrifugation Techniques: DNA-  
Precipitation & Cyto-centrifugation. In: International  
Biotechnology Laboratory, Dec. 1993, S.38;  
Central Patents Index, Basic Abstracts Journal,  
Section B, Derwent Publication Ltd., London, 1985,  
Ref. 84-281416/45 zu SU 1081-171-A;

Chemical Abstracts: Vol. 109, 1988, Ref. 145505x;  
Vol. 103, 1985, Ref. 84810e;  
Vol. 100, 1984, Ref. 151905h;  
Vol. 97, 1982, Ref. 70607e;  
Vol. 95, 1981, Ref. 185794m;  
Vol. 93, 1980, Ref. 41752k;  
Vol. 92, 1980, Ref. 54774y;

㉛ Reagenzienkit zur Präparation von Nukleinsäuren

㉜ Zur Gewinnung von Biomolekülen, insbesondere von  
Nucleinsäuren aus biologischen Proben, z. B. aus Blut,  
werden die zellulären Bestandteile einer biologischen Probe  
einer Lyse unterzogen, wobei die Zellkerne intakt bleiben,  
und in eine RNA enthaltende und in eine DNA enthaltende  
Fraktion aufgetrennt.

DE 196 07 202 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von DNA enthaltenden und RNA enthaltenden Fraktionen aus Zellen sowie einen Reagenzienkit zur Gewinnung und Auftrennung von RNA enthaltenden und DNA enthaltenden Fraktionen aus Zellen und Zellen enthaltenden biologischen Proben.

Die Entwicklung von Radioimmunoassays und ELISAs hat in den letzten Jahren eine umfangreiche Diagnostik auf Blutbasis ermöglicht. So konnten beispielsweise aus Blut von Patienten und Versuchstieren auf Proteinebene der Hormonstatus und Markermoleküle von Erkrankungen bestimmt werden. Da jedoch bei auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen basierenden Bestimmungsverfahren für jedes Antigen ein individuell abgestimmter Assay und zudem oftmals ein antigenspezifisches Extraktionsverfahren erforderlich ist, ist die Entwicklung von Radioimmunoassays (RIAs) und ELISAs aufwendig. Weiterhin können die antigenen Eigenschaften eines Analyten Ähnlichkeiten mit denen verwandter Antigene aufweisen, wodurch es zu unerwünschten Kreuzreaktionen kommen kann, die die Zuverlässigkeit und Sensitivität von solchen Tests begrenzen. Zudem sind diese Nachweisverfahren zumeist nicht in der Lage, kurzzeitige Veränderungen oder frühe Stadien einer Entwicklung, in denen nur marginale Veränderungen gegenüber dem Ausgangszustand auftreten, zu erfassen.

Aufgrund der eingeschränkten Einsatzmöglichkeiten von Nachweisverfahren auf Peptidbasis wurden sowohl für die Diagnostik als auch für die klinische und grundlagenorientierte Forschung Diagnoseverfahren auf RNA-Basis entwickelt, die herkömmlichen Peptidnachweisverfahren an Sensitivität und Spezifität weit überlegen sind.

Solche auf RNA basierende Diagnoseverfahren beruhen im allgemeinen auf der Verwendung von markierten sequenzspezifischen Sonden und setzen die Extraktion quantitativ und qualitativ bestimmbarer RNA aus einer Probe voraus. Aufgrund dieser notwendigen Voraussetzung konnte jedoch bisher die RNA-Diagnostik nicht routinemäßig für periphere mononukleäre Blutzellen (PMNB) angewendet werden, da kein ausreichend zuverlässiges, routinemäßig einsetzbares RNA-Extraktionsverfahren aus Vollblut bekannt war.

Die Diagnostik mittels RNA aus peripheren mononukleären Blutzellen wäre aber interessant, da damit u. a. hämatologische Erkrankungen, endogene Retroviren, Viren oder die Zytokinexpression von Blutzellen bei entzündlichen/immunologischen Erkrankungen nachgewiesen werden könnten.

Schwierigkeiten bei der Extraktion von RNA aus PMNB bereitet vor allem die Tatsache, daß der überwiegende Anteil (50—70%) der PMNB Granulozyten sind, die einen hohen RNase-Gehalt und einen niedrigen RNA/DNA-Quotienten aufweisen. Die Verwendung von herkömmlichen Extraktionsverfahren, in denen stark chaotrope Reagenzien wie z. B. Guanidiniumisothiocyanat eingesetzt werden, führt bei der Extraktion von RNA aus PMNB zu unakzeptabel hohen DNA-Anteilen in der extrahierten RNA. Für Routineverfahren ist jedoch eine aufwendige Reinigung der mit DNA verunreinigten extrahierten RNA, beispielsweise über einen Cäsiumchloridgradienten, nicht praktikabel.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war deshalb die Bereitstellung eines Verfahrens, das es ermöglicht, RNA und DNA weitgehend getrennt voneinander aus biolo-

gischen Proben und insbesondere aus Blut zu extrahieren.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Trennung und Isolierung von DNA enthaltenden und RNA enthaltenden Fraktionen aus biologischen Proben enthaltenden Zellen, worin man die Zellen mit einer Lösung I behandelt, die eine Lyse der Zellen bewirkt, wobei die Zellkerne jedoch intakt bleiben und durch Zentrifugation die DNA enthaltenden Zellkerne von der überstehenden, RNA enthaltenden Lösung trennt. Bevorzugt umfaßt die Lösung I ein Detergenz, ein Reduktionsmittel, dazu optional einen RNase-Inhibitor und einen Vanadylribonukleosidkomplex neben weiteren, gegebenenfalls vorhandenen üblichen Puffersubstanzen und Hilfsstoffen. Zur Lyse wird bevorzugt eine Lösung I verwendet, die 5 bis 50 mM TRIS-HCl pH 7 bis 9, 0,1 bis 1 M NaCl, 0,5 bis 4 mM  $MgCl_2$ , 0,3 bis 1% Nonidet-P-40 (NP-40), 0 bis 200 mM Dithiothreitol, 0 bis 3000 U placentären RNase-Inhibitor und 0 bis 50 mM Vanadylribonukleosidkomplex umfaßt. Besonders bevorzugt enthält die Lösung I 6 bis 14 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, 0,12 M bis 0,18 M NaCl, 1 bis 2 mM  $MgCl_2$  und 0,3 bis 1% NP-40.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können Nukleinsäuren aus einer biologischen Probe extrahiert und in eine RNA- und eine DNA-Fraktion aufgetrennt werden. Es wird eine ausreichende Trennung von DNA und RNA auch ohne den Einsatz zusätzlicher arbeitsintensiver Reinigungsschritte erreicht. Es ist möglich, die RNA im wesentlichen frei von DNA-Verunreinigungen zu erhalten. Mittels an den getrennten Fraktionen durchgeführter Konzentrationsbestimmungen, z. B. mittels optischer Dichtemessungen, können die in einer biologischen Probe vorliegenden Mengen der jeweiligen Nukleinsäuren genau bestimmt werden. Dadurch wird eine quantitative Nukleinsäurediagnostik ermöglicht.

Weiterhin ist die Qualität sowie die Quantität der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen RNA gegenüber RNA aus herkömmlichen Verfahren mit ähnlichem Zeit- und Arbeitsaufwand deutlich verbessert.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht zudem die Extraktion und Trennung und Isolierung von RNA und DNA in kurzer Zeit und schafft somit die Voraussetzungen für eine routinemäßige Nukleinsäurediagnostik.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Gewinnung von Nukleinsäuren aus Zellen biologischer Proben. Die Zellen können dabei aus Körperflüssigkeiten isoliert werden, oder es werden Zellen aus Zellkulturen oder Zellsuspensionen verwendet. Bevorzugt werden als Proben Blut, Blutzellen oder Zellkulturen und besonders bevorzugt Vollblut verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die zellulären Bestandteile einer biologischen Probe, z. B. die Zellen von Vollblut, aus der Probe abgetrennt. Man geht dabei von Blut aus oder verwendet die Blutzellen nach einer Plasmaseparation, die nach an sich bekannten Methoden ausgeführt werden kann. Die Abtrennung kann beispielsweise durch Zentrifugation in einer gekühlten Zentrifuge bei 1000 bis 2000  $\times g$  für 1 bis 5 Minuten erfolgen. Der Überstand wird dann abgetrennt, und die zellulären Bestandteile werden vorzugsweise in einer Pufferlösung gewaschen. Dazu werden die zellulären Bestandteile zunächst in einer Pufferlösung, die bevorzugt 100 bis 200 mM  $NH_4Cl$ , 5 bis 20 mM  $KHCO_3$  und 0,5 bis 2 mM Na-EDTA umfaßt, resuspendiert. Besonders bevorzugt enthält die Pufferlösung 135

bis 175 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8 bis 14 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,8 bis 1,3 mM Na-EDTA. Diese Lösung bewirkt, daß rote Blutkörperchen, die für die RNA-Isolierung unbrauchbar sind, lysiert werden und nach erneuter Zentrifugation lediglich die weißen Blutzellen für die weiteren Verfahrensschritte verbleiben. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch möglich, kleine Blutmengen (bis ca. 500  $\mu\text{l}$ ) direkt mit dieser Pufferlösung (Verhältnis ca. 1 : 2 bis 1 : 50) zu versetzen, wobei ebenfalls der Effekt erzielt wird, daß rote Blutzellen lysieren und bei einer nachfolgenden Zentrifugation lediglich die RNA- und DNA-haltigen weißen Blutzellen als Pellet erhalten werden.

Anschließend werden die zellulären Bestandteile abgetrennt. Dies geschieht bevorzugt dadurch, daß die Suspension für 1 bis 10 Minuten auf Eis gelagert wird und anschließend bei 1000 bis 2000  $\times$  g zentrifugiert wird. Der wäßrige Überstand wird daraufhin entfernt, ohne das Zellpellet zu zerstören.

Die auf diese Weise aus Blut erhaltenen Zellen oder Zellen aus Zellkulturen werden dann mit einer Lösung behandelt, die eine Lyse der Zellen bewirkt, bei der die Zellkerne intakt bleiben. Anschließend können DNA und RNA getrennt werden, da sich die DNA in den bei der Lyse intakt gebliebenen Zellkernen befindet, während die RNA in der Lösung vorliegt. Die Abtrennung erfolgt bevorzugt in einer gekühlten Zentrifuge bei 500 bis 3000  $\times$  g, vorzugsweise 1000–1500  $\times$  g für 3 bis 5 Minuten. Das Pellet der Zentrifugation, das die Zellkerne der Zellen (z. B. Blutzellen) und somit die DNA enthält, kann direkt weiterverarbeitet werden oder bei 20°C oder –80°C gelagert werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird nach der Trennung von DNA enthaltenden Zellkernen und RNA enthaltender Lösung die letztere mit einer Lösung II versetzt, welche ein Denaturierungsmittel, ein Detergens und weitere übliche Pufferkomponenten umfaßt. Der die RNA enthaltende Überstand wird bevorzugt mit etwa dem gleichen Volumen an Lösung II versetzt. Die Lösung II kann beispielsweise 5 bis 8,5 M Harnstoff, 0,1 bis 3% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,2 bis 1 M NaCl, 2 bis 20 mM EDTA und 5 bis 10 mM TRIS-HCl pH 7 bis 8 umfassen. Bevorzugt enthält die Lösung II 6 bis 8 M Harnstoff, 0,5 bis 2% SDS, 0,3 bis 0,5 M NaCl, 5 bis 15 mM Na-EDTA und 5 bis 10 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8.

Aus dem gegebenenfalls mit Lösung II versetzten Überstand kann die RNA nach an sich bekannten Methoden gewonnen werden. Dazu wird beispielsweise das gesamte Flüssigkeitsvolumen mit einer geeigneten RNA-bindenden Matrix zusammengebracht, von der die RNA dann selektiv wieder abgewaschen werden kann. Es ist auch möglich, die RNA auf herkömmliche Weise mit einem etwa gleichen Volumen eines Lösungsmittels, bestehend aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, beispielsweise mit einem Volumenverhältnis von etwa 25/24/1, und anschließend mit einem etwa gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol, beispielsweise mit einem Volumenverhältnis von etwa 24/1 zu extrahieren. Die RNA kann dann in einem 2- bis 2½fachen Volumen 100%igen Ethanol oder in einem etwa gleichen Volumen Isopropanol gefällt werden. Die Konzentrierung des Präzipitats kann durch Zentrifugation bei 10 000 bis 100 000  $\times$  g für 5 bis 30 Minuten erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Gewinnung von Nukleinsäuren aus Probenvolumen zwischen 10  $\mu\text{l}$  und 10 ml, ohne daß ihre Integrität beeinträchtigt wird, und ermöglicht eine anschließende enzymatische biochemische und molekularbiologische Ver-

arbeitung der extrahierten Moleküle. Bevorzugt wird ein Probenvolumen zwischen 50  $\mu\text{l}$  und 5 ml verwendet.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung einen Reagenzienkit zur Auftrennung von DNA enthaltenden und RNA enthaltenden Fraktion aus Zellen oder Zellen enthaltenden biologischen Proben, wobei der Reagenzienkit eine Lösung I enthält, umfassend ein Detergens, ein Reduktionsmittel, optional einen RNase-Inhibitor und einen Vanadylribonucleosidkomplex. Bevorzugt umfaßt die Lösung I 5 bis 20 mM TRIS-HCl, pH 7 bis 9, 0,1 bis 1 M NaCl, 0,5 bis 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,3 bis 1% Nonidet-P-40, 0 bis 200 mM Dithiothreitol, 0 bis 3000 U placentären RNase-Inhibitor und 0 bis 50 mM Vanadylribonucleosidkomplex. Besonders bevorzugt enthält die Lösung I 6 bis 14 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, 0,12 M bis 0,18 M NaCl, 1 bis 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,3 bis 1% NP-40.

Bevorzugt enthält der Reagenzienkit zusätzlich eine Lösung II, umfassend 5 bis 8,5 M Harnstoff, 0,1 bis 3% Natriumdodecylsulfat, 0,2 bis 1 M NaCl, 2 bis 20 mM EDTA und 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, mit der die abgetrennte RNA behandelt werden kann. Bevorzugt enthält die Lösung II 6 bis 8 M Harnstoff, 0,5 bis 2% SDS, 0,3 bis 0,5 M NaCl, 5 bis 15 mM Na-EDTA und 5 bis 10 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8. Weiterhin kann eine Pufferlösung, die bei der Gewinnung von Zellen aus Blut vorteilhaft verwendet werden kann, umfassend 100 bis 200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 bis 20 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,5 bis 2 mM EDTA enthalten sein. Diese Pufferlösung bewirkt eine Lyse von roten Blutzellen, weiße Blutzellen bleiben intakt. Besonders bevorzugt enthält die Pufferlösung 135 bis 175 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8 bis 14 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,8 bis 1,3 mM Na-EDTA.

Weiterhin kann der Reagenzienkit Mittel zur Extraktion von RNA aus wäßrigen Flüssigkeiten, z. B. eine RNA-bindende Matrix oder geeignete Lösungsmittelgemische, wie beispielsweise ein Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol mit einem Volumenverhältnis von 25/24/1 und ein Gemisch aus Chloroform/Isoamylalkohol mit einem Volumenverhältnis von 24/1 enthalten.

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Verwendung eines solchen Reagenzienkits in einem wie oben beschriebenen Verfahren.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

#### Beispiel 1

Gewinnung von Plasma, Zellkernpellets mit genomischer DNA und cytoplasmatischer RNA aus 5 ml Vollblut

5 ml EDTA-Vollblut wurden für 3 min bei 1200  $\times$  g bei 4°C in 15 ml-Röhrchen zentrifugiert und der plasmatische Überstand entfernt. Dieser kann bei –20°C zur weiteren Verarbeitung, z. B. zur Proteinbestimmung, gelagert werden.

Das das Pellet enthaltende Röhrchen wurde auf 14 ml mit einer Pufferlösung, umfassend 100 bis 200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 bis 20 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,5 bis 2 mM EDTA, aufgefüllt, gut durchmischt und für 5 min auf Eis gestellt. Der Überstand wurde vollständig abdekantiert und das verbleibende Zellpellet wurde in 1 ml einer Lösung I, umfassend 5 bis 20 mM TRIS-HCl, pH 7 bis 9, 0,1 bis 1 M NaCl, 0,5 bis 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,3 bis 1% Nonidet-P-40, 0 bis 200 mM Dithiothreitol, 0 bis 3000 U placentären RNase-Inhibitor und 0 bis 50 mM Vanadylribonucleosidkomplex resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 min

bei 1700 × g zentrifugiert. Das Zellkernpellet und der Überstand wurden getrennt. Das Zellkernpellet enthält die genomische DNA und kann bis zur weiteren Verarbeitung, z. B. für DNA-Analysen, bei -20°C gelagert werden.

Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben, das 1 ml Lösung II, umfassend 5 bis 8,5 M Harnstoff, 0,1 bis 3% Natriumdodecylsulfat, 0,2 bis 1 M NaCl, 2 bis 20 mM EDTA und 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthielt. Die so entstandene Lösung wurde zur RNA-Gewinnung den üblichen Extraktions- und Fällungsverfahren mit organischen Lösungsmitteln unterzogen.

Alternativ dazu kann der Überstand von Lösung I, gegebenenfalls zusammen mit Lösung II zur RNA-Gewinnung auch mit einer geeigneten RNA-bindenden Matrix zusammengebracht werden, von der die RNA durch Waschschritte wieder eluiert wird.

#### Beispiel 2

Gewinnung von Zellkernpellets mit genomischer DNA und cytoplasmatischer RNA aus 100 µl Vollblut und Isolierung der RNA hieraus

Durch dieses Beispiel soll gezeigt werden, daß das erfindungsgemäße Verfahren auch die Verwendung von Mikromengen an Blut als Ausgangsmaterial erlaubt.

Es wurden die gleichen Lösungen I, II und Pufferlösung wie in Beispiel 1 verwendet.

In ein geeignetes Reaktionsgefäß auf Eis oder bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml Pufferlösung eingebracht, zu der 100 µl EDTA-Vollblut pipettiert wurden. Das Blut wurde sorgfältig mit der Lösung durchmischt und das Gemisch 5 Minuten auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 3 min 1000 × g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde abgetrennt und in 700 µl Lösung I (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,65% NP-40) resuspendiert. Die Suspension wurde bei 1700 × g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand und das Zellkernpellet wurden getrennt und das Zellkernpellet bei -80°C zur weiteren Verarbeitung, z. B. für DNA-Analyse, gelagert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen wassergesättigtes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol mit einem Volumenverhältnis von 25/24/1 gegeben, 1 Minute geschüttelt (Vortex) und für 3 Minuten bei 12 000 × g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde anschließend mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol mit einem Volumenverhältnis von 24/1 zusammengegeben, 30 Sekunden geschüttelt und 5 Minuten bei 15 000 × g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde mit gleichem Volumen Lösung II (7 M Harnstoff, 1% SDS, 0,35 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) versetzt, gevortext und sofort nach Zugabe des 2½fachen Volumens an 100%igem Ethanol 20 Minuten lang bei 15 000 × g und 4°C zentrifugiert.

#### Beispiel 3

Gewinnung von cytoplasmatischer RNA aus Zellkulturen

Eine in 6-Well-Platten wachsende Zellkultur wurde mit einer geeigneten Waschlösung gewaschen, von der gesamten Flüssigkeit befreit und anschließend mit 200 µl Lösung I überschichtet. Die Zellkulturplatten wurden für 10 Minuten auf einem Rotationsschüttler geschüttelt und die Flüssigkeit anschließend vollständig

abpipettiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte, wie in Beispiel 2 beschrieben.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung und Isolierung von DNA enthaltenden und RNA enthaltenden Fraktionen aus in biologischen Proben enthaltenen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einer Lösung I behandelt, die eine Lyse der Zellen bewirkt, wobei die Zellkerne jedoch intakt bleiben, und durch Zentrifugation die DNA enthaltenden Zellkerne von der überstehenden, RNA enthaltenden Lösung trennt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung I ein Detergens und ein Reduktionsmittel neben weiteren gegebenenfalls vorhandenen üblichen Puffersubstanzen und Hilfsstoffen und optional einen RNase-Inhibitor und einen Vanadylribonucleosidkomplex enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung I 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 9, 0,1 bis 1 M NaCl, 0,5 bis 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 bis 1 & Nonidet-P-40, 0 bis 200 mM Dithiothreitol, 0 bis 3000 U placentären RNase-Inhibitor und 0 bis 50 mM Vanadylribonucleosidkomplex enthält.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung I 6 bis 14 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, 0,12 bis 0,18 M NaCl, 1 bis 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,3 bis 1% NP-40 enthält.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Trennung von DNA enthaltenden Zellkernen und RNA enthaltender Lösung die letztere mit einer Lösung II versetzt, welche ein Denaturierungsmittel, ein Detergens und weitere übliche Pufferkomponenten enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung II, enthaltend 5 bis 8,5 M Harnstoff, 0,1 bis 3% Natriumdodecylsulfat, 0,2 bis 1 M NaCl, 2 bis 20 mM EDTA und 5 bis 20 mM TRIS-HCl, pH 7 bis 8 verwendet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung II 6 bis 8 M Harnstoff, 0,5 bis 2% SDS, 0,3 bis 0,5 M NaCl, 5 bis 15 mM Na-EDTA und 5 bis 10 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8 enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 5, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die RNA enthaltende überstehende Lösung mit etwa dem gleichen Volumen an Lösung II versetzt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur RNA-Abtrennung die überstehende Lösung bzw. die überstehende Lösung, welche mit Lösung II vermischt wurde, mit einer RNA-bindenden Matrix zusammenbringt, von der RNA selektiv wieder abgewaschen werden kann, und auf diese Weise die RNA isoliert.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man zur RNA-Abtrennung die überstehende Lösung bzw. die überstehende Lösung, welche mit Lösung II vermischt wurde, in an sich bekannter Weise extrahiert.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol, und zwar jeweils mit etwa gleichem Volumen, extrahiert.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Zellen, welche aus Körperflüssigkeiten isoliert wurden, oder Zellen aus Zellkulturen oder Zellsuspensionen verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man von Blut ausgeht und nach an sich bekannten Methoden eine Plasmaseparation durchführt und die Blutzellen verwendet.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Plasmaabtrennung die Blutzellen mit einer Pufferlösung wäscht.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung 100 bis 200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 bis 20 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,5 bis 2 mM EDTA enthält.

16. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man von Vollblut ausgeht und dieses mit einer Pufferlösung, enthaltend 100 bis 200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 bis 20 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,5 bis 2 mM EDTA, versetzt und danach durch Zentrifugation die weißen Blutzellen isoliert und weiterverwendet.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung 135 bis 175 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8 bis 14 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,8 bis 1,3 Na-EDTA enthält.

18. Reagenzienkit zur Gewinnung und Auftrennung von DNA enthaltenden und RNA enthaltenden Fraktionen aus biologischen Proben erhaltenen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung I, umfassend ein Detergens, ein Reduktionsmittel und optional einen RNase-Inhibitor und/oder einen Vanadylribonucleosidkomplex, enthalten ist.

19. Reagenzienkit nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung I 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 9, 0,1 bis 1 M NaCl, 0,5 bis 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,3 bis 1% Nonidet-P-40, 0 bis 200 mM Dithiothreitol, 0 bis 3000 U placentären RNase-Inhibitor und 0 bis 50 mM Vanadylribonucleosidkomplex enthält.

20. Reagenzienkit nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung I 6 bis 14 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, 0,12 bis 0,18 M NaCl, 1 bis 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,3 bis 1% NP-40 enthält.

21. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß er des weiteren eine Lösung II umfaßt, welche 5 bis 8,5 M Harnstoff, 0,1 bis 3% Natriumdodecylsulfat, 0,2 bis 1 M NaCl, 2 bis 20 mM EDTA und 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8 enthält.

22. Reagenzienkit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung II 6 bis 8 M Harnstoff, 0,5 bis 2% SDS, 0,3 bis 0,5 M NaCl, 5 bis 15 mM Na-EDTA und 5 bis 10 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8 enthält.

23. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine Pufferlösung umfaßt, welche 100 bis 200 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 bis 20 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,5 bis 2 mM EDTA enthält.

24. Reagenzienkit nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung 135 bis 175 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8 bis 14 mM  $\text{KHCO}_3$  und 0,8 bis 1,3 Na-EDTA enthält.

25. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine RNA-bindende Matrix enthält.

26. Verwendung eines Reagenzienkits nach den Ansprüchen 18 bis 25 in einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 17.